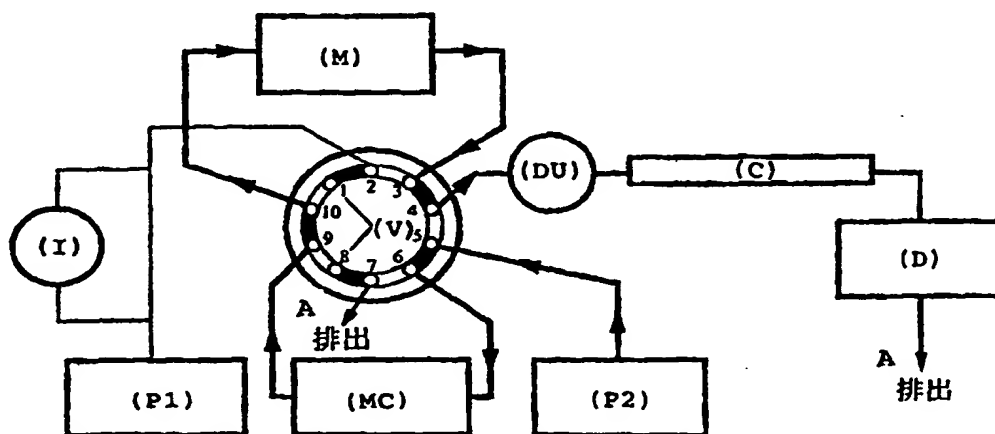




(51) 国際特許分類6 G01N 30/32, 30/34, 30/08, 30/46, 30/60, 30/72	A1	(11) 国際公開番号 WO00/29843 (43) 国際公開日 2000年5月25日(25.05.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06336 (22) 国際出願日 1999年11月12日(12.11.99) (30) 優先権データ 特願平10/328465 1998年11月18日(18.11.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) エーザイ株式会社(EISAI CO., LTD.)(JP/JP) 〒112-8088 東京都文京区小石川4丁目6番10号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 村田 薫(MURATA, Kaoru)(JP/JP) 〒305-0061 茨城県つくば市稲荷前9-7-509 Ibaraki, (JP) 真野成康(MANO, Nariyasu)(JP/JP) 〒301-0853 茨城県龍ヶ崎市松ヶ丘1-5-3 Ibaraki, (JP) 浅川直樹(ASAKAWA, Naoki)(JP/JP) 〒305-0044 茨城県つくば市並木3-26-13 Ibaraki, (JP) (74) 代理人 古谷 馨, 外(FURUYA, Kaoru et al.) 〒103-0007 東京都中央区日本橋浜町2-17-8 浜町花長ビル6階 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書

(54)Title: DIFFUSION PROMOTING APPARATUS FOR LOW FLOW VELOCITY GRADIENT HIGH-SPEED LIQUID CHROMATOGRAPHY

(54)発明の名称 低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー用の拡散促進装置



A ... DISCHARGE

(57) Abstract

An apparatus for and a method of improving the detection sensitivity for low flow velocity gradient high-speed liquid chromatography apparatuses; specifically, a diffusion promoting apparatus for low flow velocity gradient high-speed liquid chromatography apparatuses, connected to a part immediately before a separation column and having a detection sensitivity improving function.

(57)要約

本発明は、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、検出感度向上の為の装置及び方法を提供する。即ち、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、分離用カラムの直前に連結される検出感度向上機能を有する拡散促進装置である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FJ	フィジー	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
HA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明細書

低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー用の拡散促進装置

技術分野

本発明は、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、分離用カラムの直前に連結される検出感度向上機能を有する拡散促進装置及び拡散促進装置を連結することによる目的成分の検出感度向上方法及び分析方法に関する。

従来技術

高速液体クロマトグラフィーは、試料中の微量成分の分析に汎用されており、近年では質量分析装置又は核磁気共鳴装置と組合わせることにより、成分の分離と同定を高感度に行うシステムも用いられている。例えば、特開平 3-175355 号公報には、高速液体クロマトグラフィー質量分析における移動相の変換方法と装置及びトラッピングカラムに試料中の目的成分を捕捉する装置が開示されている。

しかし、例えば、高速液体クロマトグラフィー質量分析において、質量分析計における分析精度の観点からは、質量分析計に送液可能な移動相の許容流速は数十 $\mu\text{l}/\text{分}$ である。このような低流速高速液体クロマトグラフィーでは、ラインの管中での目的成分の拡散を抑制する為に、通常よりも内径が小さい管を使用することが多い。一般的には、管の内径は、分離カラムの内径と管内の線速度を考慮して選択されている。

しかし、低流速高速液体クロマトグラフィーにおいて、例えば内径 0.1 mm 以下の管を使用する場合には、管内に微粒子が詰まることがあり、低流速高速液体クロマトグラフィーによる分析は困難であった。

一方、低流速高速液体クロマトグラフィーにおいて、グラジエント溶出を行う場合、即ち、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにおいては、分離

カラムの先端で目的成分が濃縮される効果が得られる場合があることが知られている。例えば、特開平 3-175355 号公報には、この濃縮効果を効率良く得る為に、分離カラムの直前に、通常よりも太い内径 0.8 mm×長さ 100 mm の管を連結することにより、管内でグラジエント効果が生じて目的成分の分離度が向上した例が記載されている。しかし、この手法では、100 mm もの長さの管を使用する上に、分離カラムの種類や高速液体クロマトグラフィーの分析条件によっては、必ずしも分離度の向上に結びつかないことが推察される。

低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、超微量の生体成分又は環境試料・医薬品中の超微量の不純物などを分析評価する際に、その検出定量感度を高めることができる装置の開発が、非常に待ち望まれている。

図面の簡単な説明

図 1 は、溶媒の流入部の管 (1) と流出部の管 (2) から構成され、その一部分 (3) の内径が太くなっている形状を有する拡散促進装置の模式図である。

図 2 は、溶媒の流入部の管 (1) と流出部の管 (2) から構成され、その一部分 (3) の内径が太くなっている形状を有し、その部分にフリット (4) を入れた拡散促進装置の模式図である。

図 3 は、溶媒の流入部の管 (1) と流出部の管 (2) から構成され、その一部分 (3) の内径が太くなっている形状を有し、内径の太い一部分がテーパ状に広がっている拡散促進装置の模式図である。

図 4 は、溶媒の流入部の管 (1) と流出部の管 (2) から構成され、その一部分 (3) の内径が太くなっている形状を有し、内径の太い一部分 (3) がテーパ状に広がっていて、そこにフリット (4) を入れた拡散促進装置の模式図である。

図 5 は、溶媒の流入部の管 (1) と流出部の管 (2) が鋭角を成すように配置された拡散促進装置の模式図である。

図 6 は、溶媒の流入部の管 (1) と流出部の管 (2) が直角を成すように配置された拡散促進装置の模式図である。

図 7 は、溶媒の流入部の管 (1) と流出部の管 (2) が鈍角を成すように配置

された拡散促進装置の模式図である。

図 8 は、分離用カラムの直前に拡散促進装置が連結された低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置の模式図である。

図 9 は、分離用カラムの直前に拡散促進装置が連結された低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置の模式図である。

図 10 は、拡散促進装置を連結していない低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにより得られたクロマトグラムである。

図 11 は、図 1 に示す本願発明にかかる拡散促進装置を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにより得られたクロマトグラムである。

図 12 は、図 2 に示す本願発明にかかる拡散促進装置を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにより得られたクロマトグラムである。

図 13 は、図 5 に示す本願発明にかかる拡散促進装置を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにより得られたクロマトグラムである。

図 14 は、図 6 に示す本願発明にかかる拡散促進装置を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにより得られたクロマトグラムである。

図 15 は、図 7 に示す本願発明にかかる拡散促進装置を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにより得られたクロマトグラムである。

発明の開示

以上のような状況に鑑み、本発明者らは鋭意検討した結果、以下に示す構成により所期の目的を達成できることを見出し、本発明を完成した。

本発明は、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、分離用カラムの直前に連結される検出感度向上機能を有する拡散促進装置である。

また、本発明は、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、分離用カラムの直前に拡散促進装置を連結することによる目的成分の検出感度向上方法である。

本発明は、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、試料中の分析目的成分を濃縮し、拡散し、分離することによる微量の目的成分の分

析方法でもある。

拡散促進装置は、溶媒の流入部と流出部の管から構成され、1) 溶媒の流入部又は流出部の管の一部分の内径が太くなっていること、又は2) 溶媒の流入部と流出部の管が一定の角度を有するように配置されること、又は1)と2)の両者を有することを特徴とする装置である。

成分濃縮用カラムを分離カラムの直前に配置した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーシステムにおいて、拡散促進装置は、成分濃縮用カラムと分離カラムの間に管を通じて連結される。拡散促進装置は、成分濃縮用カラムから溶出した目的成分を含む試料バンドを、その装置内で溶媒の流路を変えて拡散させ、均一な溶液を形成する作用を有している。この均一な溶液が、分離カラムへ導入される為、グラジエント溶出における分離カラム先端での濃縮効果が効率よく得られることになる。そして、結果的に、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにおいて、目的成分の評価に用いられる分離カラムの理論段数の増加と当該ピーク形状の改善が達成され、目的成分の定量検出感度を向上させることが可能となる。

低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにおいて、通常に用いられる配管の内径は0.1 mm以下である。しかし、本発明にかかる拡散促進装置を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにおいては、例えば、その装置内の溶媒の流入部と流出部の管の間の一部分の内径を太く（内径0.13 mm又は0.25 mm）して、他のライン部分の管には内径0.13 mm以下の配管を使用することによって、目的成分の検出感度向上が可能である。また、拡散促進装置の溶媒の流入部と流出部の管の間の内径が太くなっている部分をより長くすることにより、分離カラムに連結された直前の管内及び分離カラム内の目詰まり防止が可能である。

拡散促進装置における溶媒の流入部と流出部の管が成す一定の角度とは、鋭角、直角または鈍角のいずれでも良い。また、拡散促進装置内には、フリット（膜）を入れても良い。フリット（膜）は、例えば、焼結フィルター、セラミック、金属メッシュ又はセルロース繊維などが挙げられるが、もちろん、これらに限定さ

れる訳ではない。

特に、拡散促進装置が、溶媒の流入部と流出部の管から構成され、1) 溶媒の流入部又は流出部の管の一部分の内径が太くなっていること、又は2) 溶媒の流入部と流出部の管が一定の角度を有するように配置されること、又は1) と2) の両者を有することを特徴とするものであって、かつ、その流入部及び/又は流出部の管内にフリット（膜）を有する構造である場合には、目的成分の拡散促進と分離カラム内における微粒子の目詰まり防止を同時に効率よく達成することが可能となる。

拡散促進装置は、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置であればいずれに組み込んでも検出感度向上機能及び/又は装置内目詰まり防止機能を有している。低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置とは、例えば、内径0.5～1 mmのマイクロカラムを有して数十 μ l/分の流速で使用するグラジエントマイクロ高速液体クロマトグラフィー装置、内径1～2.5 mmのセミマイクロカラムを有して50～250 μ l/分の流速で使用するグラジエントセミマイクロ高速液体クロマトグラフィー装置又は内径0.5 mm以下のキャピラリーカラムを有して数 μ l/分の流速で使用するグラジエントキャピラリー高速液体クロマトグラフィー装置などが挙げられる。

尚、拡散促進装置は、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、分離用カラムの直前に設置することが望ましく、より好ましくは、成分濃縮用カラムと分離用カラムの間に連結することが望ましい。

本発明にかかる拡散促進装置を分離カラムの直前に連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置の一例について、以下に詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるわけではない。

本発明は、図8中、送液ポンプ（P1）、インジェクター（I）、切替えバルブ（V）、成分濃縮用カラム（M）、切替えバルブ（V）、溶媒ミキシング装置（MC）及び切替えバルブ（V）の順に連結し、別のラインにより送液ポンプ（P2）、切替えバルブ（V）、拡散促進装置（DU）、分離カラム（C）及び検出器（D）を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーである。

本発明は、また、上記の低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにおいて、送液ポンプ（P 1）により送られる移動相により目的成分を成分濃縮用カラム（M）に捕捉し、切替えバルブを切替えることにより、送液ポンプ（P 2）により送られる移動相により、拡散促進装置（D U）による目的成分の拡散を経由して、分離カラム（C）から目的成分を流出させる検出・定量感度の向上した試料中微量成分の分析方法である。

さらに、本発明は、図 9 中、送液ポンプ（P 1）、切替えバルブ（V）、溶媒ミキシング装置（M C）及び切替えバルブ（V）を連結し、別のラインにより送液ポンプ（P 2）、切替えバルブ（V）、拡散促進装置（D U）、分離カラム（C）及び検出器（D）を連結し、更に別のラインにより切替えバルブ（V）、成分濃縮用カラム（M）及び切替えバルブ（V）を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーである。本発明は、また、この低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにおいて、目的成分を成分濃縮用カラム（M）に注入し、この時送液ポンプ（P 1）により溶媒ミキシング装置（M C）に溶媒を充填して置き、切替えバルブを切替えることにより、ポンプ（P 2）により送られる移動相により、拡散促進装置（D U）による目的成分の拡散を経由して、分離カラム（C）から目的成分を流出させる検出定量感度の向上した試料中微量成分の分析方法である。

本発明にかかる拡散促進装置は、溶媒の流入部及び流出部の管を加工して組み合わせたものであり、そのまま使用しても良いが、小型の容器内に設置しても良い。溶媒の流入部及び流出部の管や容器の材質は、特に限定されない。

拡散促進装置用の小型の容器として、例えば、直線型ユニオン、三方型ユニオン又は T 字型ユニオンなどが使いやすいが、これらを用いる時は移動相が漏れることを防ぐためにフェラル等を使用して溶媒の流入管及び流出管をしっかりとねじ込むことが望ましい。

図 1～図 7 に本発明にかかる拡散促進装置の概念図の一例を示したが、もちろんこれらに限定されるわけではない。

また、図 1～図 7 の拡散促進装置は、溶媒の流入部の管（1）を成分濃縮用力

ラムに、流出部の管（２）を分離カラムに連結して用いるが、その逆に連結しても良い。即ち、管（１）を分離カラムに、管（２）を成分濃縮用カラムに連結して使用しても良好な拡散促進効果が得られる。

図１は、溶媒の流入部の管（１）と流出部の管（２）の一部分（３）の内径が太くなっているものであり、例えば直線型ユニオンを使用した例であり、図２は、図１の装置内の内径が太くなっている部分（３）の一部にフリット（４）を入れた拡散促進装置である。

図３は、図１と同様のメカニズムの拡散促進装置であり、溶媒の流入部の管（１）と流出部の管（２）の一部分（３）の内径が太くなっているものであり、図４は、図３の装置内の内径の太くなっている部分（３）にフリット（４）を入れた拡散促進装置である。また、図３及び図４に示すように、拡散促進装置内部の移動相の流路は、流入部の管（１）から流出部の管（２）に向かって、又は流出部の管（２）から流入部の管（１）に向かってテーパ状に広がっていることは好ましい一例である。これは、拡散装置内における試料の拡散を容易にするためである。

図５～図７は、溶媒の流入部の管（１）と流出部の管（２）が一定の角度を有するように配置された拡散促進装置であり、例えば、図５及び図７では三方型ユニオンを、図６ではＴ字型ユニオンを使用した例である。流入部の管（１）と流出部の管（２）が形成する角度が、図５では鋭角、図６では直角、図７では鈍角である。いずれも、両方の管の交差部分（５）で溶媒の流路が変化させ、試料バンドの拡散を生じさせる機能を有しているものである。また、図５に示すように、装置内の管の一部分にラインフィルター等のフリット（４）を入れても良い。

本発明における拡散促進装置は、以下のように構成された低流量グラジエント高速液体クロマトグラフィー内に配置することにより、微量成分の高速・高感度分析に適した検出感度向上機能を有するシステムとなる。

本システムを図８より詳細に説明する。

図８は低流量グラジエント高速液体クロマトグラフィーの模式図であり、送液ポンプ（P１）、インジェクター（I）、切替えバルブ（V）、拡散膜及び吸着

膜からなる成分濃縮用カラム (M)、切替バルブ (V)、溶媒ミキシング装置 (MC) 及び切替バルブ (V) が順に連結され、別に送液ポンプ (P 2)、切替バルブ (V)、拡散促進装置 (DU)、分離カラム (C) 及び検出器 (D) が連結されている。この低流量グラジエント高速液体クロマトグラフィー・システムにおける成分の濃縮・分離方法は次のようである。

(A) 送液ポンプ (P 1) から成分濃縮用移動相を送出し、インジェクター (I) から試料溶液を注入し、成分濃縮用移動相で試料溶液を希釈しながら成分濃縮用カラム (M) へ試料を送液して試料中の目的成分を成分濃縮用カラム (M) に捕捉させる。同時に成分濃縮用移動相で、溶媒ミキシング装置を満たす。成分濃縮用移動相とは、成分濃縮カラムに目的成分を吸着させるための移動相であり、成分濃縮カラムが疎水的性質を有する場合には、水等の比較的極性の大きな溶媒である。

(B) 次に、送液ポンプ (P 2) から送出される試料分離用移動相をバルブ (V) を切替えて溶媒ミキシング装置 (MC)、成分濃縮用カラム (M)、拡散促進装置 (DU)、分離用カラム (C) および検出器 (D) を経て排出させる。試料分離用移動相とは、成分濃縮用カラム (M) から試料成分を離脱させ、さらに分離用カラム (C) において試料成分を分離するための移動相であり、成分濃縮用カラム (M) が疎水的性質を有する場合は、例えばメタノール、アセトニトリル等の、成分濃縮用移動相より極性の小さな溶媒である。この時、成分濃縮用移動相と試料分離用移動相を溶媒ミキシング装置 (MC) にて混合し、両者の移動相の混合にグラジエントを形成させながら成分濃縮用カラム (M) に送液し、捕捉した試料中の目的成分を脱離させる。そして、拡散促進装置 (DU) 内において、溶媒の流路を変え目的成分を含む試料バンドを拡散させ、均一な溶液を形成させる。この均一な溶液が、分離カラムへ導入される為、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにおいて、目的成分の評価に用いられる分離カラムの理論段数の上昇と当該ピーク形状の改善が達成される。

即ち、分離カラムにおける目的成分の定量検出感度が著しく向上するが、これが本システムの特徴の一つである。

ここでポンプとは高速液体クロマトグラフィー用の送液ポンプであり、好ましくは、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー用の送液ポンプである。また、バルブとは高速液体クロマトグラフィー用の十方バルブ、六方バルブ等である。インジェクターとは高速液体クロマトグラフィー中に試料溶液を注入するための装置であり、分離カラムとは試料中の目的成分を分離するためのカラムであり、目的に応じていわゆる順相カラム、逆相カラム等を適宜選択できる。これら装置は市販のものを使用することができる。

本発明にかかる低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーの別のシステムを図9により説明する。図9は、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーの模式図であり、送液ポンプ（P1）、切替えバルブ（V）、溶媒ミキシング装置（MC）及び切替えバルブ（V）が順に連結され、別に送液ポンプ（P2）、切替えバルブ（V）、拡散促進装置（DU）、分離カラム（C）及び検出器が連結され、更に別のラインにより切替えバルブ（V）、成分濃縮用カラム（M）及び切替えバルブ（V）が連結されている。

図9に示すシステムにおける成分の濃縮・分離方法は次のようである。

（A）移動相1が送液ポンプ（P1）から送出され、溶媒ミキシング装置（MC）を満たす。切替えバルブ（V）に装着された成分濃縮用カラムに、切替えバルブのインジェクションポートから試料溶液を注入し、試料中の目的成分を上記成分濃縮用カラムに捕捉させた後、更に適当な溶媒で目的成分を膜から脱離させないようにして洗浄する。

（B）次に、切替えバルブ（V）を切替えてポンプ（P2）から試料分離用移動相を溶媒ミキシング装置（MC）、成分濃縮用カラム、分離用カラム（C）及び検出器（D）へと送液する。この時、移動相1と試料分離用移動相を溶媒ミキシング装置（MC）中で混合し、両者の混合にグラジエントを形成させながら、成分濃縮用カラムに送液し、捕捉した試料中の目的成分を脱離させ、拡散促進装置（DU）内で溶媒の流路を変え目的成分を含む試料バンドを拡散させ、均一な溶液を形成させる。これを分離用カラム（C）に流入させて目的成分を分離する。この時、成分濃縮用カラムを通過する試料分離用移動相の流路は、試料溶液を注

入した方向と反対方向である。また、図 9 に示すシステムでは、試料溶液を成分濃縮用カラムに手動で注入することが可能であり、試料溶液の大量処理、成分の高速濃縮を可能とするものである。

本発明によると、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、分離用カラムの直前に拡散促進装置を連結することにより、目的成分の検出感度向上が可能となる。

実験例

低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにおいて、目的成分のピーク高さと理論段数に及ぼす拡散促進装置の形状の影響

図 8 に示した低流量グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置を用い、拡散促進装置 (DU) として図 1 に示す直線型ユニオン、図 2 に示すフリットを入れた直線型ユニオン、図 5、図 6 又は図 7 に示す溶媒流入部と流出部の成す角度の異なる三方型ユニオン装置のいずれかを連結し、試料成分を注入してクロマトグラム of ピーク形状の比較評価を行った。尚、対照として、拡散促進装置を連結していない低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーを用いた評価も行った。

試料成分として、安息香酸 *n*-プロピル (A)、安息香酸ベンジル (B)、安息香酸 *n*-ブチル (C) 及び安息香酸 *n*-ヘキシル (D) をそれぞれ $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように 10% アセトニトリル水溶液に溶解したものをを用いた。尚、試料の注入量は、 $10 \mu\text{L}$ である。

図 10 ~ 図 15 に、種々の形状の拡散促進装置を低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーに連結した時に得られた個別のクロマトグラムを示した。即ち、図 10、図 11、図 12、図 13、図 14、図 15 は、各々、拡散促進装置を連結していない低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー、図 1 に示す拡散促進装置を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー、図 2 に示す拡散促進装置を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー、図 5 に示す拡散促進装置を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフ

イー、図6に示す拡散促進装置を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー、図7に示す拡散促進装置を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにより得られた試料成分A～Dのクロマトグラムである。

拡散促進装置を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー（クロマトグラムは図11～図15）において、拡散促進装置を連結していない低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー（クロマトグラムは図10）と比較して、試料成分のピークがシャープになり、特に（B）及び（C）成分のピーク高さの増加が顕著であった。

さらに、（C）成分について、図10～図15のクロマトグラムからクロマトグラム中の該ピークの評価項目としてピーク高さと理論段数を算出し、拡散促進装置の形状が両ファクターに及ぼす影響について検討を行った。

一般に、混合物の各成分を分析する時に、目的成分のピーク幅が広がって隣接ピークと重なりあうと分離が不完全になる。したがって、ピーク幅が広がらないような実験条件を求める必要があり、通常はこのピーク幅の広がりの評価の尺度として理論段数（N）が用いられる。また、理論段数（N）は、 $(4VR/W)^2$ で表される。ここで、VR＝目的成分の保持時間、W＝目的成分のピーク幅である。

実験結果のまとめを、表1に示した。

表1

拡散促進装置の形状	ピーク高さ	理論段数 (N)
装置なし	83640	38612
直線型ユニオン (フリットなし)	136915	-
直線型ユニオン (フリットあり)	128862	71728
鋭角の流路	125570	-
直角の流路	108062	66915
鈍角の流路	122534	-

拡散促進装置を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにおいて、拡散促進装置を連結していない低流速グラジエント高速液体クロマトグラ

フィーと比較して、目的成分のピーク高さと分離カラムの理論段数の明らかな増加が認められた。また、拡散促進装置の形状による両ファクターに及ぼす差違はほとんど認められなかった。

尚、図11、図13、図15に示すように、拡散促進装置の使用により目的成分のピークがより一層シャープになりチャート紙上で振り切れてしまう例では、理論段数の算出はできなかった。

さらに、拡散促進装置を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィーにおいては、分離カラム直前の管及び分離カラムの目詰まりは認めなかった。

以上から、分離用カラムの直前に連結される本発明にかかる拡散促進装置は、低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、顕著な検出感度向上機能を有することは明らかである。

表1の実験データ及び図10～図15のクロマトグラムは、以下の分析条件により得られたものである。

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：254nm）

分離用カラム：Inertsil ODS-2 (0.7mm I.D. × 150mm)

濃縮用移動相：0.1%酢酸アンモニウム水溶液

試料分離用移動相：0.1%酢酸アンモニウム含有アセトニトリル・エタノール

混液（500：500）

流量：濃縮用移動相：1.0ml/min

試料分離用移動相：0.025ml/min

請求の範囲

1. 低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、分離用カラムの直前に連結される検出感度向上機能を有する拡散促進装置。
2. 低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、分離用カラムの直前に拡散促進装置を連結することによる目的成分の検出感度向上方法。
3. 溶媒の流入部と流出部の管から構成され、1) 溶媒の流入部又は流出部の管の一部の内径が太くなっていること、又は2) 溶媒の流入部と流出部の管が一定の角度を有するように配置されること、又は1) と2) の両者を有することを特徴とする請求項1記載の拡散促進装置。
4. 溶媒の流入部と流出部の管が成す一定の角度が、鋭角、直角又は鈍角である請求項3記載の拡散促進装置。
5. 溶媒の流入部及び/又は流出部の管内に、フリットを有する請求項1又は請求項3記載の拡散促進装置。
6. フリットが、焼結フィルター、セラミック、金属メッシュ又はセルローズ繊維である請求項5記載の拡散促進装置。
7. 低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置が、グラジエントミクロ高速液体クロマトグラフィー装置、グラジエントセミマイクロ高速液体クロマトグラフィー装置又はグラジエントキャピラリー高速液体クロマトグラフィー装置である請求項1記載の拡散促進装置。
8. 分離用カラムの直前に請求項1又は請求項3記載の拡散促進装置を設置することを特徴とする低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置。
9. 成分濃縮用カラムと分離用カラムの間に請求項1又は請求項3記載の拡散促進装置を連結することを特徴とする低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置。
10. 図8中、送液ポンプ(P1)、インジェクター(I)、切替えバルブ(V)、成分濃縮用カラム(M)、切替えバルブ(V)、溶媒ミキシング装置(MC)及び切替えバルブ(V)の順に連結し、別のラインにより送液ポンプ

(P 2)、切替えバルブ (V)、請求項 1 又は請求項 3 記載の拡散促進装置 (D U)、分離カラム (C) 及び検出器 (D) を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置。

1 1. 図 9 中、送液ポンプ (P 1)、切替えバルブ (V)、溶媒ミキシング装置 (MC) 及び切替えバルブ (V) を連結し、別のラインにより送液ポンプ (P 2)、切替えバルブ (V)、請求項 1 又は請求項 3 記載の拡散促進装置 (D U)、分離カラム (C) 及び検出器 (D) を連結し、更に別のラインにより切替えバルブ (V)、成分濃縮用カラム (M) 及び切替えバルブ (V) を連結した低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置。

1 2. 請求項 1 0 記載の低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、送液ポンプ (P 1) により送られる移動相により目的成分を成分濃縮用カラム (M) に捕捉し、切替えバルブを切替えることにより、送液ポンプ (P 2) により送られる移動相により、請求項 1 又は請求項 3 記載の拡散促進装置 (D U) による目的成分の拡散を経由して、分離カラム (C) から目的成分を流出させる検出定量感度の向上した試料中微量成分の分析方法。

1 3. 請求項 1 1 記載の低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、目的成分を成分濃縮用カラム (M) に注入し、この時送液ポンプ (P 1) により溶媒ミキシング装置 (MC) に溶媒を充填して置き、切替えバルブを切替えることにより、ポンプ (P 2) により送られる移動相により、請求項 1 又は請求項 3 記載の拡散促進装置 (D U) による目的成分の拡散を経由して、分離カラム (C) から目的成分を流出させる検出定量感度の向上した試料中微量成分の分析方法。

1 4. 低流速グラジエント高速液体クロマトグラフィー装置において、試料中の分析目的成分を濃縮し、拡散し、分離することによる微量の目的成分の分析方法。

図 1

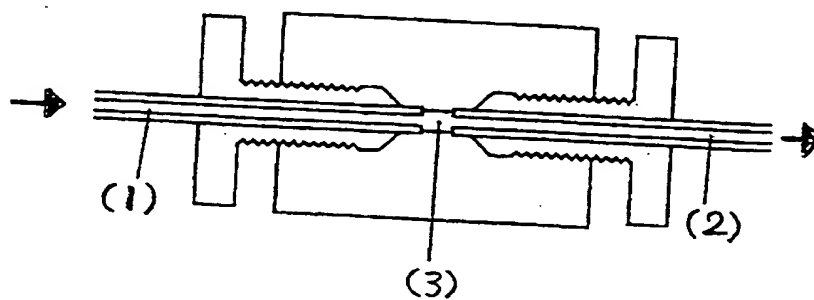


図 2

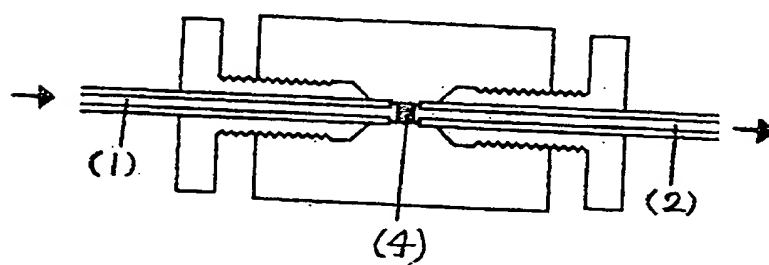


図 3

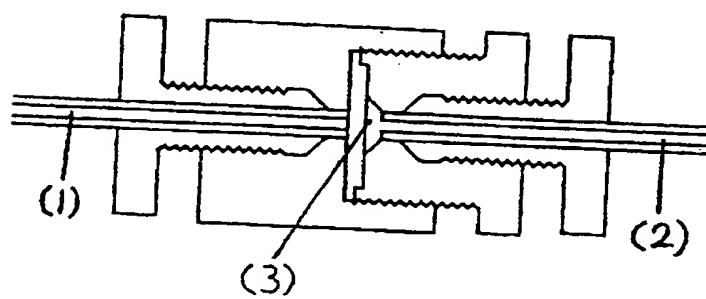


図 4

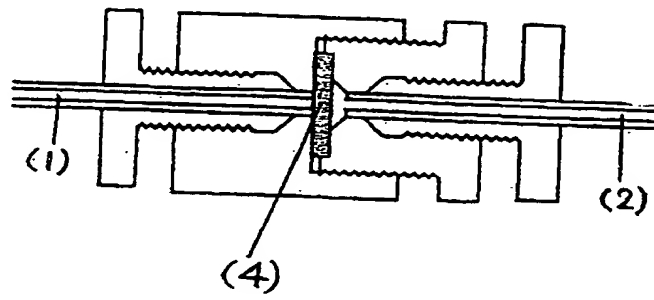


図 5

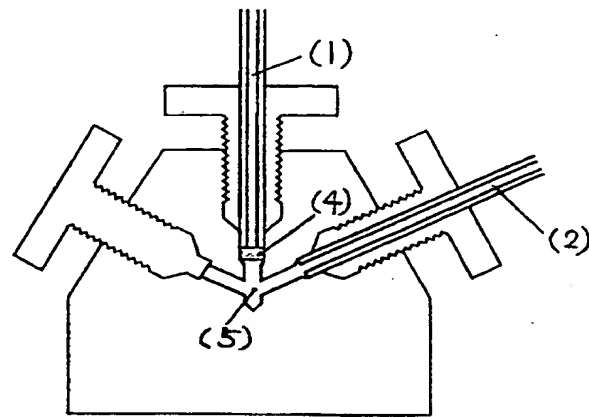


図 6

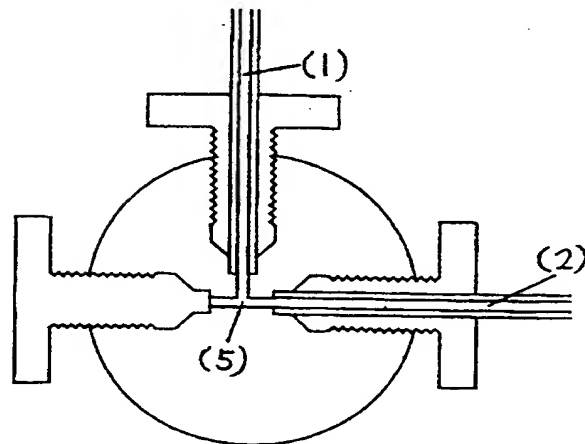


図 7

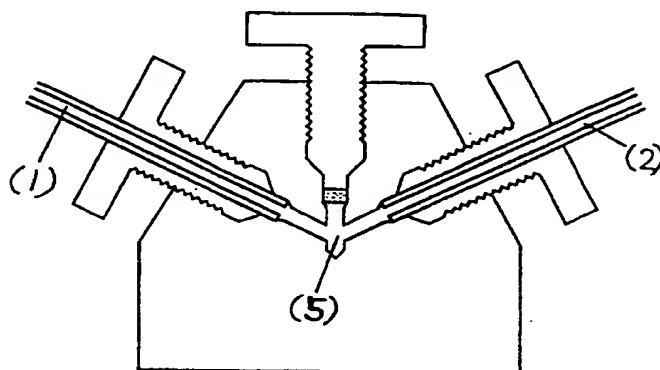


図 8

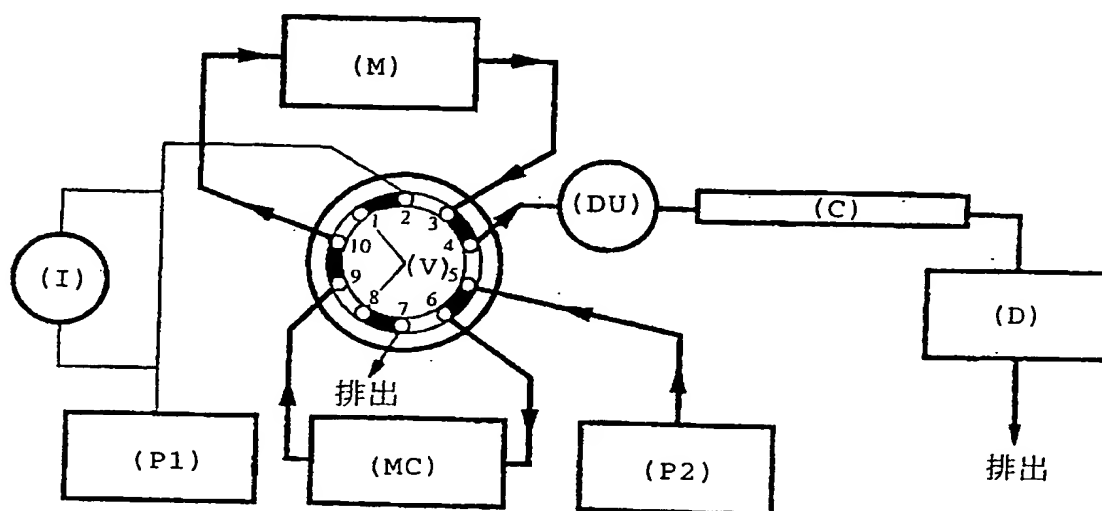
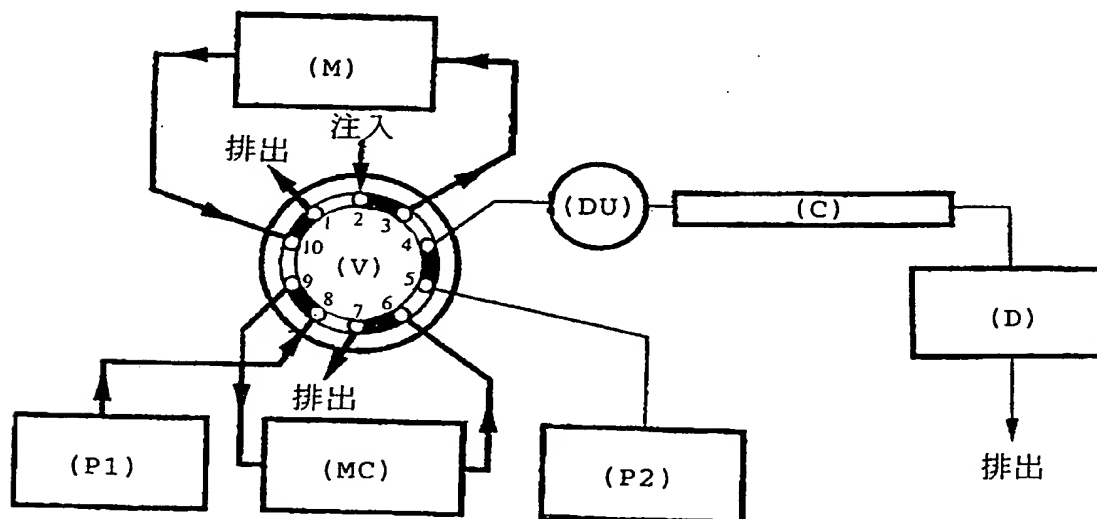
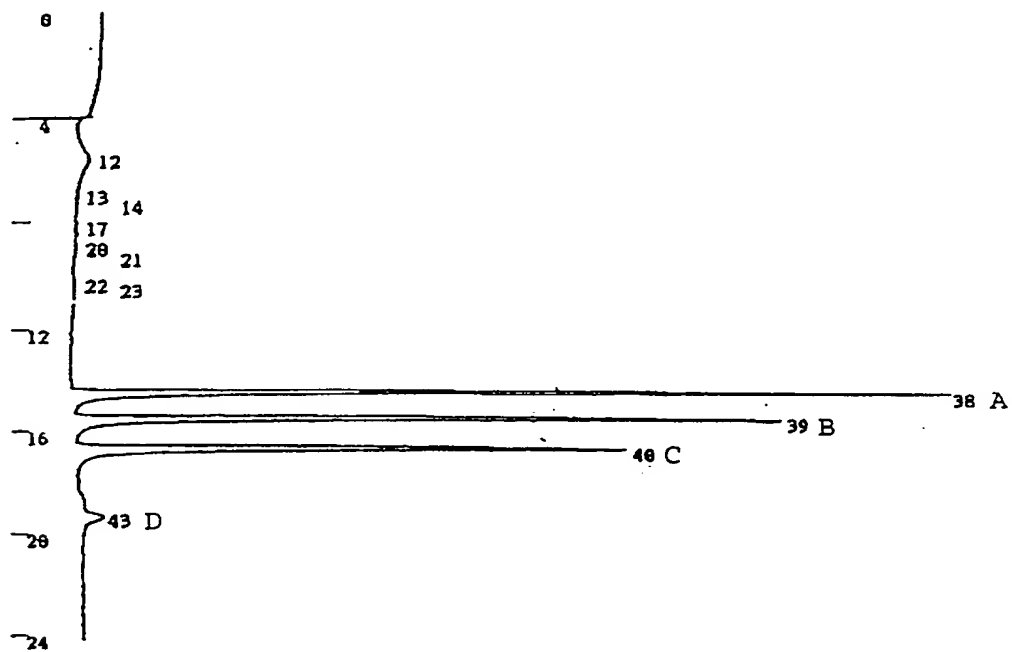


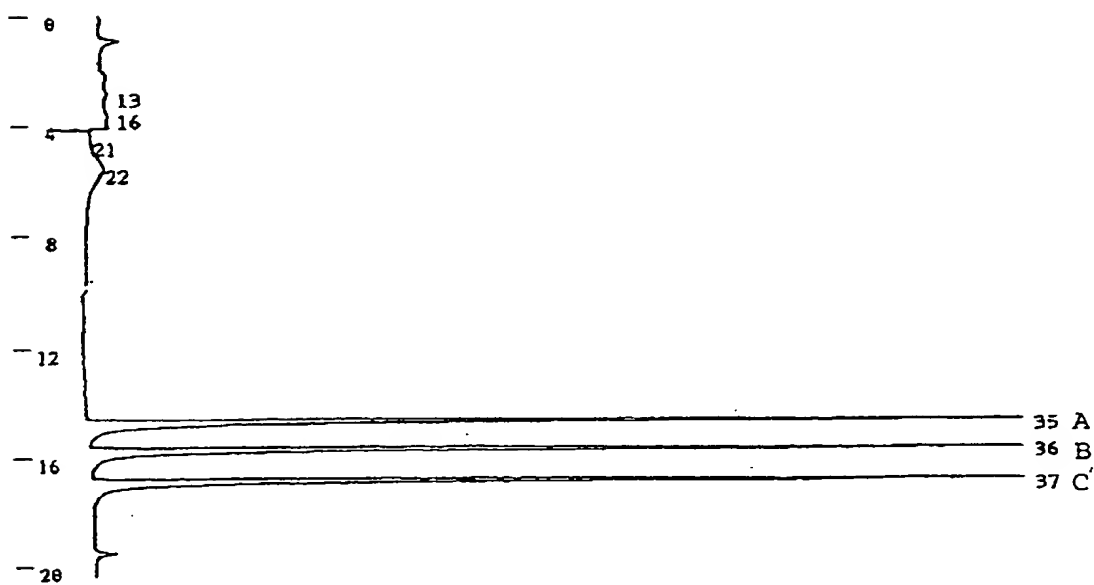
図 9



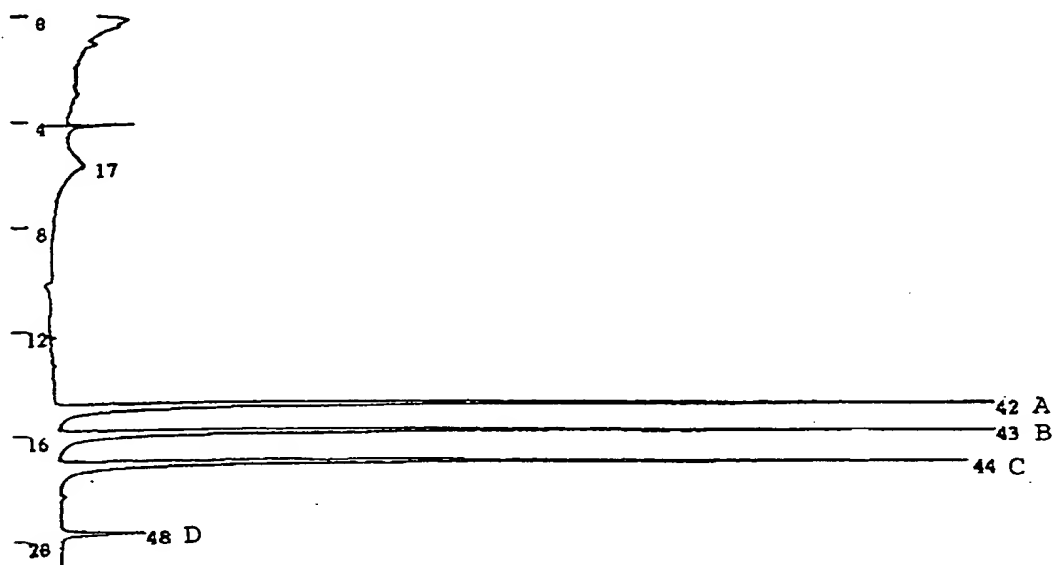
☒ 10



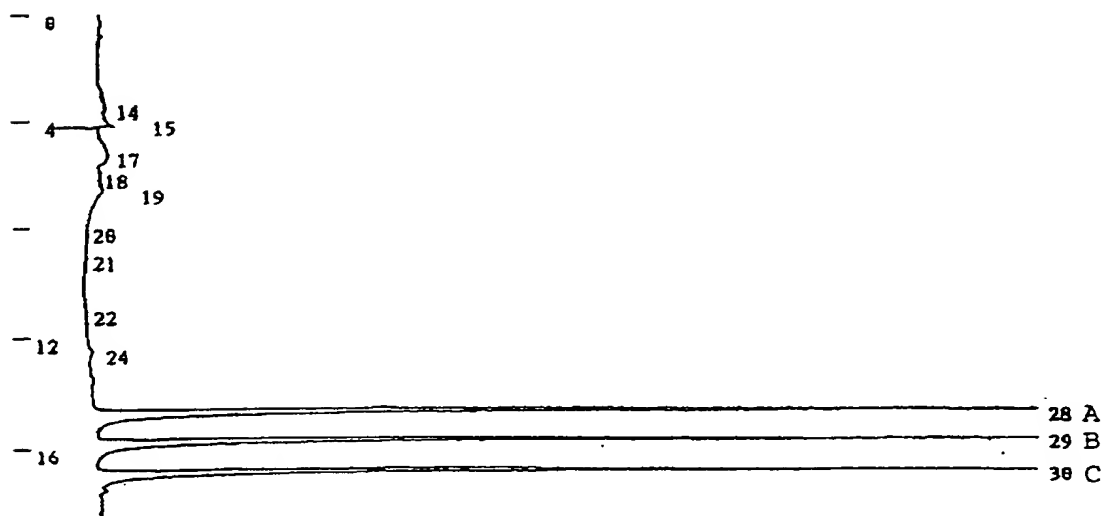
☒ 11



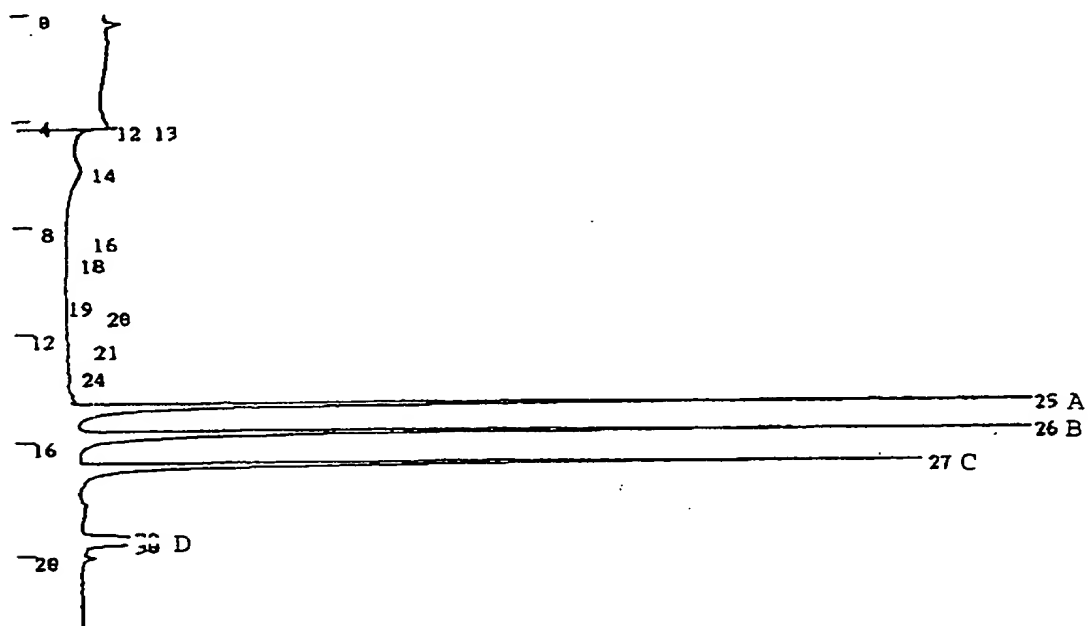
☒ 12



☒ 13



☒ 14



☒ 15



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06336

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ G01N30/32, G01N30/34, G01N30/08, G01N30/46, G01N30/60, G01N30/72

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ G01N30/32, G01N30/34, G01N30/08, G01N30/46, G01N30/60, G01N30/72

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1926-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1999
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1999 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-1999

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI/DIALOG (IC=G01N30/32+G01N30/34)

JICST FILE(JOIS) (chromatography*[gradient]*[diffusion + low flow velocity])

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 3-175355, A (EISAI CO., LTD.), 30 July, 1991 (30.07.91), page 7, upper left column, line 10 to lower left column, line 4 & EP, 417976, A2 & EP, 417976, B1 & DE, 69026779, C0 & DE, 69026779, T2	1-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 November, 1999 (29.11.99)

Date of mailing of the international search report
07 December, 1999 (07.12.99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/06336

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁶ G01N30/32, G01N30/34, G01N30/08, G01N30/46, G01N30/60, G01N30/72		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁶ G01N30/32, G01N30/34, G01N30/08, G01N30/46, G01N30/60, G01N30/72		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1926-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-1999年 日本国登録実用新案公報 1994-1999年 日本国実用新案登録公報 1996-1999年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) WPI/DIALOG (IC=G01N30/32+G01N30/34) JICSTファイル(JOIS) (クロマトグラフィー*[グラジエント+勾配]*[拡散+低流速])		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 3-175355, A (エーザイ株式会社) 30.7月. 1991 (30.07.91) 第7頁左上欄第10行~左下欄第4行 & EP, 417976, A2 & EP, 417976, B1 & DE, 69026779, C0 & DE, 69026779, T2	1-14
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 29.11.99	国際調査報告の発送日 07.12.99	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 郡山 順 印	2 J 8502
電話番号 03-3581-1101 内線 3252		



2

1
.
.

1
.
.